薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110(5) 341-348 (1990)

生薬・マムシの薬理活性研究(第2報¹⁾) マウス網内系の貪食能に及ぼす
50% エタノールエキスの影響

森浦俊次,* 松田秀秋, 久保道德
近畿大学薬学部

Pharmacological Study on *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE. II.¹⁾
Effect of 50% Ethanolic Extract on Phagocytic Activity of
Mouse Reticuloendothelial System

Toshitsugu MORIURA,* Hideaki MATSUDA and Michinori KUBO
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,
3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577, Japan

(Received January 29, 1990)

Effect of a 50% ethanolic extract ([M]) from dried whole body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE on a phagocytic activity of reticuloendothelial system was studied by the carbon clearance method in mice. The clearance-rate of carbon was significantly shortened 1 h after the oral administration of [M] (250 or 500 mg/kg, one time/d for 3d). [M] activated the phagocytosis of carbon by macrophage (M ϕ) in the spleen and the phagocytosis of latex by peritoneal M ϕ . These results suggested that [M] may promote the phagocytic activity on the reticuloendothelial system in mice and has a stimulatory effect on M ϕ .

Keywords—*Agkistrodon blomhoffii blomhoffii*; carbon clearance; macrophage; reticuloendothelial system; phagocytosis

マムシ *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE²⁾ は本邦に広く生息する毒蛇で、この全身を蒸焼きあるいはそのまま乾燥したものは生薬・マムシ(マムシ)と称され、古くから滋養強壯薬として用いられている。³⁾ また、頭部と筋肉のついた骨部の乾燥品は反鼻と称され、マムシと同じ薬効を期待して用いられている。一方、中国では梁代の『名医別録⁴⁾』に、マムシと同族の近縁種を蝮蛇の名称で収載され、近代中国においても蝮蛇は強壯、病後や虚弱な体質の改善薬として用いられている。⁵⁾ 著者らは、マムシの滋養強壯作用を薬理的に検討し、その50% エタノールエキスを抗胃潰瘍作用を見出し報告した。¹⁾

本報では、マムシが虚弱体質の改善作用を目的に用いられていることから、³⁾ 初期免疫の一端を担っている macrophage (M ϕ) の貪食能に及ぼす影響を検討した。

実 験 の 部

1. 実験材料及び試薬 実験材料には日本産マムシ *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE の全身、マムシの皮及び内臓を取り除いたいわゆる反鼻、皮及び内臓を乾燥し粗末としたものを用いた。各々の粗末 600 g に 50% ethanol 2 l を加え、20°C, 72 時間、3 回抽出し、得た凍結乾燥エキス(エキス収率はそれぞれ 10.1, 7.2, 7.6, 16.4% で、以下これらの 50% エタノールエキスはそれぞれ、全身を [M], 反鼻を [H], 皮を [K], 内臓を [N] と略記した)を被験体に供した。実験動物にはこれらのエキスを用水に懸濁して経口投与した。

また、陽性対照薬あるいは試薬には perikan drawing ink 17 black (Perikan AG), bacto-latex (Difco Lab.), λ -carrageenan [東京化成工業(株)], zymosan (Sigma Chemical) を用いた。

2. 実験動物 実験動物は市販(清水実験材料株式会社)の Slc: ICR 系雌性マウス(18—22 g)を用いた。飼育環境は温度 23 $\pm$ 1°C, 湿度 60 $\pm$ 5% の恒温恒湿, 12 時間明/12 時間暗のサイクルの飼育室で、市販の固形飼料(ラボ MR ストック, 日本農産)を用い、自由に水を摂取させ、購入後実験に供するまで 1 週間予備飼育した。

3. マウス貪食能の測定 1) Intact マウス——マウス貪食能は carbon clearance 法⁶⁾で行った。Carbon

懸濁液 (perikan drawing ink 17 black 3 ml, 生理食塩水 4 ml, 3% gelatin 4 ml の混液) 0.1 ml/10 g をマウス尾静脈に注射し, 4, 8, 12 分後に眼窩からヘパリン処置ヘマトクリット毛細管を用いて 25 μ l の血液を採血し, 直ちに 2 ml の 0.1% Na_2CO_3 溶液に希釈溶血させ, 分光光度計 (島津製作所 UV-160) により, 波長 675 nm で吸光度を測定した. また, 12 分後採血群は断頭脱血後, 肝臓及び脾臓を摘出し, 体重比湿重量%を求めた. Carbon clearance 値は次式から血中 carbon 半減消失時間 ($t_{1/2}$, 分), 食食指数 (K) 及び訂正食食指数 (α) で求め, これらの値を被験体の carbon 食食能とした. なお, 水に懸濁 (0.2 ml/10 g に調整) した被験体は carbon 懸濁液静注 2 日前から 1 日 1 回連日 3 回経口投与 (最終投与は carbon 懸濁液静注 1 時間前) した. また, 陽性対照薬に zymosan (生理食塩水に懸濁) 50 mg/kg を用い, carbon 懸濁液静注 2 日前に 1 回腹腔内投与した.

$$\text{血中カーボン半減消失時間 } (t_{1/2}, \text{分}) = (t_2 - t_1) / (1/2) \text{OD}_{t_1} / (\text{OD}_{t_1} - \text{OD}_{t_2})$$

$$\text{食食指数 } (K) = (\log \text{OD}_{t_1} - \log \text{OD}_{t_2}) / (t_2 - t_1)$$

$$\text{訂正食食指数 } (\alpha) = \sqrt[3]{K \cdot P_c / P_o}$$

ただし, t_1 : 4 分, t_2 : 8 分あるいは 12 分, OD_{t_1} : 4 分後の吸光度, OD_{t_2} : 8 分あるいは 12 分後の吸光度, P_c : 全体重, P_o : 肝臓, 脾臓の湿重量である.

2) Carrageenan 処置マウス——マウスに carrageenan (生理食塩水に溶解) 50 mg/kg を腹腔内投与し, 投与 2 日後に 1) の方法で血中 carbon 半減消失時間を測定した. なお, 被験体は carrageenan 投与 2 日前から 1 日 1 回連日 3 回経口投与 (最終経口投与は carrageenan 投与 1 時間前) した.

4. 肝臓, 脾臓, 肺臓及び腎臓に取り込まれた Carbon の光顕的観察 3. の方法で被験体及び carbon 懸濁液を投与し, carbon 懸濁液静注 10, 20, 30 分後にマウスを断頭致死させ, 肝臓, 脾臓, 肺臓及び腎臓を摘出し, 10% formalin で固定後包埋し, 更に薄切, hematoxylin-eosin (HE) 染色を行い, 光顕的に carbon の取り込みを観察した. また, 腎臓はカーボン懸濁液静注 5 日後において, 上記の方法で組織像を光顕的に観察した.

5. 肝臓, 脾臓, 腎臓に取り込まれた Carbon 量の測定 マウスに被験体及び carbon 懸濁液を 3. の方法で投与し, carbon 懸濁液静注, 15 分後あるいは 5 日後に断頭脱血後, 直ちに肝臓, 脾臓及び腎臓を摘出した. 臓器中に取り込まれた carbon 量は Fisher⁷⁾ の方法で測定した. すなわち, 約 100 mg の肝臓, 脾臓あるいは腎臓を 10% KOH-70% EtOH 1 ml と 2% gumarabic 2 ml の混液で 60°C, 24 時間溶解後, 水で肝臓及び脾臓は 5 倍に希釈した. この溶解液を分光光度計により, 800 nm で吸光度を測定し, 肝, 脾及び腎臓 100 mg 当たりの OD 値にて肝, 脾, 腎臓内に取り込まれた carbon 量とした.

6. 腹腔浸出細胞液中の細胞数及びその Lysosome 酵素活性の測定 被験体あるいは zymosan を 3. に記した方法で投与したマウスの腹腔内に heparin (30 U/ml) 加生理食塩水を 4 ml 注入し, 1 分間マウスの腹部をマッサージ後, 断頭致死させて腹腔浸出細胞液 (PECs) を採取した. 採取した PECs を falcon dish に入れ, 37°C, 20 分間 CO_2 インキュベーター (Sanyc MCO-175) 中で静置し adherent cells を $\text{M}\phi$ とした. $\text{M}\phi$ 数は PEC 数から nonadherent cells を差し引いたものとした. PEC 及び $\text{M}\phi$ (それぞれ 1×10^6 cells) を 0.1% triton X-100 で処置し, それらの上清を lysosome 酵素活性測定のための試料液とした. Lysosome 酵素活性は acid phosphatase 活性を *p*-ニトロフェニルリン酸法 (Acid Phosphatase β -Test Wako, 和光純薬) により測定した. PEC, $\text{M}\phi$ の数及びそれらの lysosome 酵素活性に及ぼす被験体の影響は対照群の細胞数及び lysosome 酵素活性を 100% とした時の割合で示した.

7. 腹腔 $\text{M}\phi$ の Latex 食食率の測定 10% ウシ胎児血清 Eagle medium (heparin 5 U/ml を同時添加) 3 ml をマウス腹腔内に投与し, 1 分間マウスの腹部をマッサージ後, 断頭致死させて PECs を採取した. 1000 rpm, 10 分間遠心分離後, 上清を除き, 10% ウシ胎児血清含有 eagle medium を加え, 培地内の細胞数を 2×10^6 cells/ml に調整した. 調整液 1 ml ずつをカバーグラスを入れた falcon dish に分注し, CO_2 インキュベーターで 4 時間培養後, 同培地で洗浄し, 更に同培地で 24 時間培養した. 上澄液を除き, 被験体含有培地を加えて 24 時間培養した. 培養液の上澄液を除いた後, 培地 0.9 ml と bacto-latex (2×10^8 cells/ml) 0.1 ml の混液を加えて 30 分間培養した. Falcon dish から $\text{M}\phi$ の付着したカバーグラスを取り出してスライドグラス上に載せ, 50 個の $\text{M}\phi$ が食食した latex 数を鏡検下でカウントし, 平均値を latex 食食数とした. 被験体の latex 食食活性化率は, 細胞質内に顆粒を有する $\text{M}\phi$ が存在することから latex 粒子無添加時の食食数を測定し, 対照及び被験体処置時の latex 食食数を補正後, 対照群の latex 食食数を 100% とした時の割合で示した. なお, 被験体は 5% dimethyl sulfoxide 生理食塩水に溶解し, メンブランフィルター (pore size 0.4 μ m) を通過したものを被験液とした.

8. 統計学的処理 実験結果は平均値±標準誤差で表し, 有意差検定には Student's *t*-test を適用した.

結 果

1. マウス食能に及ぼす影響

1) Intact マウス Table I に示したごとく, マウスに carbon 懸濁液を注入すると, 対照群の血中 carbon 半減消失時間は 13—17 分であった. [M] 250, 500 mg/kg 投与群には血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させる作用が認められた. [M] の各部位エキスでは, [N] 100 mg/kg 投与群に血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させる作用が認められ, [H] 500 mg/kg 投与群にもその傾向が認められたが, [K] 投与群にはその作用が認

TABLE I. Effects of 50% Ethanolic Extract from *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* ([M]), Its Various Portion Extracts and Zymosan on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Clearance-rate of carbon ^{g)} ($t_{1/2}$, min)
Control ^{a)}	—	<i>p.o.</i>	15	16.69±0.73
[M] ^{c)}	100	<i>p.o.</i>	15	14.67±0.79
	250	<i>p.o.</i>	15	13.51±0.83 ^{h)}
	500	<i>p.o.</i>	15	12.55±0.47 ⁱ⁾
Control ^{a)}	—	<i>p.o.</i>	15	13.02±0.75
[H] ^{d)}	250	<i>p.o.</i>	15	12.08±0.92
	500	<i>p.o.</i>	15	11.41±1.12
[K] ^{e)}	50	<i>p.o.</i>	15	11.09±0.75
	100	<i>p.o.</i>	15	11.94±0.75
	250	<i>p.o.</i>	15	13.32±1.33
Control ^{a)}	—	<i>p.o.</i>	15	16.69±0.73
[N] ^{f)}	50	<i>p.o.</i>	15	15.04±0.60
	100	<i>p.o.</i>	15	14.38±0.68 ^{h)}
Control ^{b)}	—	<i>i.p.</i>	15	12.57±0.89
Zymosan	50	<i>i.p.</i>	15	9.14±0.68 ⁱ⁾

Carbon clearance test was performed 1 h after the oral administrations of test substances (one time/d for 3 d). a) Control was orally administered water alone. b) Control was intraperitoneally administered saline alone. c) [M], 50% ethanolic extract from dried whole of *A. blomhoffii blomhoffii*. d) [H], 50% ethanolic extract from dried head, bone and muscle of *A. blomhoffii blomhoffii*. e) [K], 50% ethanolic extract from dried hide of *A. blomhoffii blomhoffii*. f) [N], 50% ethanolic extract from dried internal organs of *A. blomhoffii blomhoffii*. g) Each value represents the mean±S.E. h) Significantly different from the control group, $p<0.05$. i) Significantly different from the control group, $p<0.01$.

TABLE II. Effects of 50% Ethanolic Extract from *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) and Zymosan on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	% body weight		$K^d)$ ($\times 10^{-2}$)	$\alpha^{e,f)}$
				Liver	Spleen		
Control ^{a)}	—	<i>p.o.</i>	15	5.50±0.14	0.49±0.03	1.47±0.07	4.09±0.12
[M] ^{c)}	100	<i>p.o.</i>	15	5.58±0.20	0.51±0.04	1.78±0.10	4.20±0.15
	250	<i>p.o.</i>	15	5.49±0.11	0.52±0.02	1.94±0.14 ^{h)}	4.45±0.11 ^{g)}
	500	<i>p.o.</i>	15	5.66±0.16	0.52±0.03	2.05±0.09 ^{h)}	4.45±0.11 ^{g)}
[N] ^{c)}	50	<i>p.o.</i>	15	5.50±0.07	0.51±0.03	1.65±0.08	4.24±0.10
	100	<i>p.o.</i>	15	5.48±0.12	0.59±0.04	1.78±0.09 ^{g)}	4.26±0.09
Control ^{b)}	—	<i>i.p.</i>	15	5.61±0.07	0.55±0.02	1.89±0.12	4.68±0.13
Zymosan	50	<i>i.p.</i>	15	5.61±0.10	0.54±0.02	2.34±0.07 ^{h)}	5.43±0.12 ^{h)}

Carbon clearance test was performed 1 h after the administrations of test substances (one time/d for 3 d). a) Control was orally administered water alone. b) Control was intraperitoneally administered saline alone. c) [M], [N], see the Table I. d) K is phagocytic index. e) α is corrected phagocytic index. f) Each value represents the mean±S.E. g) Significantly different from the control group, $p<0.05$. h) Significantly different from the control group, $p<0.01$.

TABLE III. Effect of 50% Ethanolic Extract from *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Carrageenan-Treated Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Clearance-rate of carbon ^{c)} ($t_{1/2}$, min)
Intact	—	<i>p.o.</i>	15	13.96±0.80
Control ^{a)}	—	<i>p.o.</i>	15	23.08±2.18
[M] ^{b)}	250	<i>p.o.</i>	15	19.99±1.66
	500	<i>p.o.</i>	15	18.43±1.65

Carrageenan (50 mg/kg, i.p.) was treated 1 h after administration of test substance (one time/d for 3 d) and carbon clearance test was performed 2 d after the administration of carrageenan. a) Control was orally administered water alone. b) [M], see the Table I. c) Each value represents the mean±S.E.

められなかった。陽性対照薬に用いた zymosan 50 mg/kg 投与群にも血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させる作用が認められた。

また、マウス食能に及ぼす [M], [N] の影響を K , α 値で評価し、その結果は Table II に示した。[M] 250, 500 mg/kg 投与群には K 及び α 値を有意に増加させる作用が認められたが、相対肝、脾重量には影響を及ぼさなかった。[N] は 100 mg/kg の投与量で、 K 値を有意に増加させ、 α 値を増加させる傾向を示した。陽性対照薬に用いた zymosan 50 mg/kg 投与群にも K , α 値を有意に増加させる作用が認められた。

2) Carrageenan 処置マウス Table III に示したごとく、マウスに carrageenan 50 mg/kg を腹腔内投与すると、血中 carbon 半減消失時間は intact マウスのそれに比して延長した。[M] 500 mg/kg 投与群には carrageenan 投与による血中 carbon 半減消失時間の延長を抑制する傾向が認められた。

2. 肝臓、脾臓、肺臓及び腎臓に取り込まれる Carbon 粒子の光顕的観察

肝臓 注入された carbon は肝臓では Kupffer cell 及び血中の遊離 $M\phi$ に取り込まれ鏡検下に黒点として観察された (Fig. 1)。また、肝臓中の黒点は時間の経過 (10—30 分後) に伴って増加した。

脾臓 脾臓では注入された carbon は白髄類リンパ組織が赤髄に移行する marginal zone の $M\phi$ に取り込まれ、鏡検下に黒点として観察され、肝臓と同様に時間の経過に伴って増加した (Fig. 2)。

肺臓 肺臓ではほとんど carbon 粒子の取り込みが観察されなかった (成績は省略)。

腎臓 腎臓ではほとんど carbon 粒子の取り込みが観察されなかった (成績は省略)。

3. 肝臓、脾臓、腎臓に取り込まれる Carbon 量に及ぼす影響

肝臓 Carbon 懸濁液静注 15 分あるいは 5 日後の肝臓に取り込まれた carbon 量は Fig. 3 に示した。[M] 投与群には肝臓における carbon の取り込みを促進させる作用が認められなかった。陽性対照薬に用いた zymosan 50 mg/kg 投与群には carbon 懸濁液静注 15 分後における carbon の取り込みを有意に促進させる作用が認

Fig. 1. Liver of Mouse Given a Carbon Suspension i.v. and Sacrificed 30 min Later

Carbon particles were evenly distributed in all the Kupffer cells. (H. E. stain; $\times 80$).

Fig. 2. Spleen of Mouse Given a Carbon Suspension i.v. and Sacrificed 30 min Later

Carbon particles were internalized by macrophages of marginal zones between white pulp and red pulp in the spleen. (H. E. stain; $\times 80$).

Fig. 3. Effects of 50% Ethanolic Extract from the Dried Whole of *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) and Zymosan on Hepatic Uptake of Carbon in Mice Given an Injection of Carbon

□, control (water) p.o.; ▤, [M] 250 mg/kg p.o.; ▥, [M] 500 mg/kg p.o.; ■, control (saline) i.p.; ▦, zymosan 50 mg/kg i.p.

Carbon suspension was injected 1 h after the oral administration of [M] (one time/d for 3 d) and carbon contents of the liver were measured 15 min or 5 d after the injection of carbon suspension. Zymosan was intraperitoneally administered 2 d before the injection. Control was orally administered water or intraperitoneally injected saline alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 15 mice. ^a) Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

Fig. 5. Kidney of Mouse Given a Carbon Suspension i.v. and Sacrificed 5d Later

Carbon particles were internalized in glomeruli. (H. E. stain; $\times 80$).

められた。

脾臓 Carbon 懸濁液静注 15 分あるいは 5 日後の脾臓に取り込まれた carbon 量は Fig. 4 に示した。[M] 500 mg/kg 投与群には carbon 静注 15 分後の脾臓における carbon の取り込みを促進させる傾向が認められ、5 日後では carbon の取り込みを有意に促進させる作用が認められた。一方、zymosan は脾臓における carbon の取り込みを促進させる作用が認められなかった。

腎臓 Carbon 懸濁液静注 5 日後の腎臓の組織像は Fig. 5 に示した。Carbon 懸濁液静注 30 分後ではカーボン粒子の黒点がまったく観察されなかったが、5 日後では腎糸球体にカーボン粒子の黒点が観察された。また、

Fig. 4. Effects of 50% Ethanolic Extract from the Dried Whole of *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) and Zymosan on Splenic Uptake of Carbon in Mice Given an Injection of Carbon

□, control (water) p.o.; ▤, [M] 250 mg/kg p.o.; ▥, [M] 500 mg/kg p.o.; ■, control (saline) i.p.; ▦, zymosan 50 mg/kg i.p.

Carbon suspension was injected 1 h after the oral administration of [M] (one time/d for 3 d) and carbon contents of the spleen were measured 15 min or 5 d after the injection of carbon suspension. Zymosan was intraperitoneally injected 2 d before the injection. Control was orally administered water or intraperitoneally injected saline alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 15 mice. ^a) Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

Fig. 6. Effects of 50% Ethanolic Extract from the Dried Whole of *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) and Zymosan on Nephric Uptake of Carbon in Mice Given an Injection of Carbon

□, control (water) p.o.; ▤, [M] 250 mg/kg p.o.; ▥, [M] 500 mg/kg p.o.; ■, control (saline) i.p.; ▦, zymosan 50 mg/kg i.p.

Carbon suspension was injected 1 h after the oral administration of [M] (one time/d for 3 d) and carbon contents of the kidney were measured 5 d after the injection of carbon suspension. Zymosan was intraperitoneally injected 2 d before the injection. Control was orally administered water or intraperitoneally injected saline alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 15 mice.

TABLE IV. Effects of 50% Ethanolic Extract from *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) on Lysosomal Enzyme Activity of Peritoneal Exudate Cells (PEC) and Peritoneal Macrophage in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	% acid phosphatase ^{d)}	
				PEC	Mφ
Control ^{a)}	—	<i>p.o.</i>	15	100	100
[M] ^{c)}	100	<i>p.o.</i>	15	107.5±12.2	105.5±13.2
	250	<i>p.o.</i>	15	115.5±15.0	119.0±22.5
	500	<i>p.o.</i>	15	122.9±13.4	123.5±16.9
Control ^{b)}	—	<i>i.p.</i>	15	100	100
Zymosan	50	<i>i.p.</i>	15	241.5±30.8	253.9±33.6

Acid phosphatase activity of peritoneal exudate cells and peritoneal macrophages were measured 1 h after the administration of test substance (one time/d for 3 d). Zymosan was intraperitoneally injected 2 d before the measurement of acid phosphatase activity. The values were expressed as the percent increase in the value of each control containing no test substance as 100%. a) Control was orally administered water alone. b) Control was intraperitoneally injected saline alone. c) [M], see the Table I. d) Each value represents the mean±S.E.

carbon 懸濁液静注 5 日後の腎臓に取り込まれた carbon 量は Fig. 6 に示した。[M] 500 mg/kg 投与群の腎臓に取り込まれた carbon 量は対照群のそれに比して減少傾向であった。また、その傾向は zymosan 投与群にも認められた。

4. 腹腔浸出細胞数及び腹腔 Mφ 数に及ぼす影響

[M] 50, 250, 500 mg/kg 投与群には腹腔浸出細胞数及び腹腔 Mφ 数を増加させる作用が認められなかった。陽性対照薬に用いた zymosan 50 mg/kg 投与群には対照群の腹腔浸出細胞数及び腹腔 Mφ 数を 100% としたとき、腹腔浸出細胞数を $232 \pm 30\%$, Mφ 数を $388 \pm 59\%$ 増加させる作用が認められた(成績は省略)。

5. 腹腔浸出細胞及び腹腔 Mφ の Lysosome 酵素活性に及ぼす影響

対照群の腹腔浸出細胞及び腹腔 Mφ の lysosome 酵素活性を 10^6 cells 当たりの *p*-nitrophenol 量で求めるとそれぞれ、 128.1 ± 17.2 , 166.2 ± 22.9 mmol であった。Table IV に示したごとく、対照群の lysosome 酵素活性を 100 としたとき、[M] 500 mg/kg 投与群には腹腔浸出細胞及び腹腔 Mφ の lysosome 酵素活性を約 23% 亢進させる作用が認められた。陽性対照薬に用いた zymosan 50 mg/kg 投与群には lysosome の酵素活性を著しく亢進させる作用が認められた。

6. 腹腔 Mφ の Latex 粒子貪食に及ぼす影響

Table V に腹腔 Mφ 1 個が貪食した latex 粒子の数を示した。[M] 500 µg/ml 添加群には腹腔 Mφ の latex 粒子貪食を有意に増加させる作用が認められた。

TABLE V. Effect of 50% Ethanolic Extract from *A. blomhoffii blomhoffii* ([M]) on Phagocytosis of Latex by Peritoneal Macrophage

Treatment	Concentration (µg/ml)	No. of phagocytosed latex ^{b)}	% of activity
Control	—	3.53 ± 0.54	100
[M] ^{a)}	50	4.39 ± 0.65	124
	250	6.94 ± 0.44	197
	500	$13.01 \pm 1.11^c)$	369

a) [M], see the Table I. b) Each value represents the mean±S.E. of 6 experiments. c) Significantly different from control group, $p < 0.01$.

考 察

古来、生薬・マムシが虚弱体質及び易感染体質の改善作用を目的に用いられていることから、本報では免疫応答に及ぼす影響をマウス網内系機能を指標に検討した。網内系機能には①感染防御作用、②異物の貪食及び排除作用、③血清蛋白の生成及び分泌作用、④蛋白質、脂質及び糖質代謝作用、⑤抗腫瘍免疫、抗感染免疫などの免疫応答機能などがある。網内系に特異的な異物の貪食、排除作用は Mφ と称される遊走性の貪食細胞である肝 Kupffer cell, 単球及び組織球が異物貪食に主要な働きを持つ。⁸⁾ 今回は、これら Mφ の多彩な働きの中でも特に異物貪食に及ぼすマムシ 50% エタノールエキス ([M]) の影響を carbon clearance 法で検討し、マムシの薬効の裏付けを行うとともに、有効成分の単離の指標としての薬理作用を見い出すための検討を行った。

Carbon clearance 法による網内系機能検査において, [M] 投与群には血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させる作用が認められ, [M] に M ϕ 活性化作用が示唆された. 血中に注入されたカーボン粒子は, 主に網内系の主要臓器である肝臓で約 90%, 脾臓で約 10% 取り込まれ, 肺臓にはほとんど取り込まれないといわれている.⁹⁾ そこで, [M] による carbon clearance を亢進させる作用は固定型 M ϕ を質的に亢進させたのか, あるいは量的に亢進させたのかを明らかにする目的で carbon clearance 値を貪食指数 (K), 訂正貪食指数 (α) 値で評価した. その結果, [M] の 3 日間投与は相対肝, 脾重量に影響を与えずに K , α 値を有意に増加させた. すなわち, [M] は固定型 M ϕ を質的に活性化させ, その結果, 血中 carbon 半減消失時間が短縮されたものと思われる.

次に, 血中に注入された carbon がいずれの臓器において取り込まれたのかを明らかにするために, carbon 懸濁液注入後血中 carbon 半減消失時間に達する 15 分後に肝臓, 脾臓, 肺臓及び腎臓を摘出し, 取り込まれた carbon 量を光顕的に観察した. その結果, 注入された carbon は主に肝臓及び脾臓に取り込まれていた. [M] は脾臓における carbon 粒子の取り込みを亢進させる傾向を示した. また, carbon 懸濁液静注 5 日後に肝臓, 脾臓を摘出し carbon 量を測定した. さらに, 木村ら¹⁰⁾はマウスの月齢が増すと肝臓あるいは脾臓における carbon の取り込みが減少し, 腎糸球体における carbon の取り込みが増大すると報告していることから, 腎臓も摘出し, 取り込まれた carbon 量を測定した. その結果, [M] は脾臓における carbon の取り込みを対照群のそれに比して有意に増大させたが, 腎臓においては, 対照群のそれよりも低い取り込み量であった. これは, 肝臓あるいは脾臓に取り込まれた carbon は消化されず, 再び血中に放出され, 免疫担当臓器以外の臓器にも carbon が観察されたものと思われる. [M] は carbon 懸濁液注入 5 日後においても脾臓における carbon の取り込みを有意に増大させ, 脾臓固定型 M ϕ の活性化作用が持続していることが観察された. しかし, 対照群の腎臓に取り込まれた carbon 量に比して [M] 投与群のそれは低かった. この結果は, [M] の脾臓固定型 M ϕ の活性化作用によって免疫担当臓器でない腎臓への carbon の流入を妨げた結果であると思われる. 陽性対照薬の zymosan は肝臓における carbon の取り込みを増大させ, その結果, 腎臓への carbon の流入を妨げる作用が認められた.

さらに, [M] のマウス網内系の貪食機能亢進作用を検討する目的で, carrageenan 処置マウスを用いて carbon clearance を行った. Carrageenan は藻類から分離された多糖体¹¹⁾で, その生物学的作用は急性炎症の誘発,¹²⁾ Hageman factor の活性化,¹³⁾ 血栓症の誘発,¹⁴⁾ 肝細胞障害性¹⁵⁾などがあるといわれている. 網内系に対しては M ϕ を遊離, 固定型を問わず障害するが, 白血球にはほとんど影響を及ぼさないといわれている.¹⁶⁾ Carrageenan 50 mg/kg をマウス腹腔内投与 48 時間後に carbon clearance を行くと, 血中 carbon 半減消失時間が延長した. Carrageenan 腹腔内投与 2 日前から [M] を 3 回連続経口投与したが, carrageenan 処置による血中 carbon 半減消失時間の延長を有意に抑制する作用が見い出せなかった. この結果は, intact マウスにおける carbon clearance 試験時の [M] の作用動態と一致するもので, [M] は脾臓 M ϕ を主に活性化させるとと思われる.

次に, 遊離型 M ϕ に及ぼす [M] の影響を腹腔浸出細胞及び腹腔 M ϕ の数, lysosome 酵素活性, 腹腔 M ϕ の latex 貪食を指標に検討した. [M] はこれらの試験法において遊離型 M ϕ 数に影響を及ぼさなかったが, lysosome 酵素活性及び腹腔 M ϕ の latex 貪食能を増大させ, 遊離型 M ϕ を質的に活性化させる作用が認められた.

一方, 日本産マムシと同属動物を基源とする「蝮蛇」は使用部位によって生薬名が「蝮蛇骨」, 「蝮蛇脂」, 「蝮蛇胆」, 「蝮蛇皮」, 「蝮蛇蛻皮」などの名称があげられ, それぞれ薬効が異なる.¹⁷⁾ そこで, マムシの有効成分の検索を行う予試験としてマムシの皮, 内臓及びそれ以外の部分 (いわゆる反鼻と称される部分) のそれぞれ 50% エタノール抽出エキスを調製し, carbon clearance を行った. その結果, 内臓エキス投与群には血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させ, K , α 値を有意に増大させる作用が認められた. これらのことから [M] の M ϕ 活性化成分は内臓により多く存在すると思われる.

以上のことから, マムシはマウス網内系の M ϕ 貪食能を質的に活性化し, 網内系の貪食能を亢進させると考えられる. これらの結果は, マムシが古来, 虚弱体質や易感染体質の改善薬に用いられていたことを裏付ける一結果であろう. また, 内臓により高い活性が認められたことから, マムシを薬用利用する際は, 内臓を取り除く反鼻よりも全身を用いるマムシの方がより高い薬効が得られるものと思われる. この結果は, 前報¹⁾で抗胃潰瘍作用を検討したときと一致する結果であった.

謝辞 本研究を行うにあたり, 実験材料及びご援助を頂いた (株) 阪本漢法製薬に深謝致します.

引用文献

- 1) 第1報: 久保道德, 森浦俊次, 牧野琢生, 松田秀秋, 薬誌, **109**, 592 (1989).
- 2) M. Toriba, *Acta Herpetologica Sinica.*, **5**, 61 (1986); K. H. Gloyd, *Herpetology*, **9**, 75 (1982).
- 3) 小泉清見, “日本醫藥動物,” 丸山舎書店, 東京, 1935, pp. 128—131.
- 4) 唐 慎微 (編), “重修政和經史證類備用本草,” 人民衛生出版社影印, 北京, 1957, p. 445.
- 5) 高 士賢, 戴 定遠, 範 勤德, 鄧 明魯, “常見藥用動物,” 上海科学技術出版, 上海, 1984, pp. 183—184.
- 6) D. M. Weir (ed.), A. E. Stuart, J. A. Habesham, A. E. Davidson, “Hand-Book Experimental Immunology,” Vol. 2, Black Well Scientific Publications, Oxford, 1973, p. 19.
- 7) S. Fisher, W. B. Riley, C. D. Shorey, *J. Path. Bacto.*, **96**, 463 (1968).
- 8) 栗屋和彦, 医学のあゆみ, **111**, 107 (1979).
- 9) G. Biozzi, B. Benacerraf, B. N. Halpern, *Br. J. Exp. Pathol.*, **34**, 441 (1953).
- 10) 木村正人, 長瀬光昌, 本田西男, 医学のあゆみ, **125**, 1130 (1983).
- 11) A. W. Thomson, E. F. Fowler, R. G. P. Dugh-Humphreys, *Int. J. Immunopharmac.*, **1**, 247 (1979).
- 12) C. A. Winter, E. A. Risley, G. W. Nuss, *Proc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544, (1962).
- 13) H. J. Schwar, R. W. Kellermeyer, *Proc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 1021 (1969).
- 14) A. W. Thomson, C. H. W. Horne, *Br. J. Exp. Pathol.*, **57**, 455 (1976).
- 15) D. E. Bice, D. G. Gruwell, J. E. Salvaggio, E. O. Hoffmann, *Immunol. Commun.*, **1**, 615 (1972).
- 16) A. C. Allison, J. S. Harington, M. Birbeck, *J. Exp. Med.*, **124**, 141 (1966).
- 17) 上海科学技術出版社, 小学館 (編), “中藥大辞典,” 小学館, 東京, 1985, pp. 2307—2308.